

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication :
(A n'utiliser que pour
le classement et les
commandes de reproduction).

2.201.299

(21) N° d'enregistrement national :
(A utiliser pour les paiements d'annuités,
les demandes de copies officielles et toutes
autres correspondances avec l'I.N.P.I.)

73.04782

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

1^{re} PUBLICATION

- (22) Date de dépôt 9 février 1973, à 16 h 29 mn.
(41) Date de la mise à la disposition du public de la demande..... B.O.P.I. — «Listes» n. 17 du 26-4-1974.
- (51) Classification internationale (Int. Cl.) C 07 g 17/00; G 01 n. 31/14, 33/16.
- (71) Déposant : Société dite : SYNTEX CORPORATION, résidant au Panama.
- (73) Titulaire : *Idem* (71)
- (74) Mandataire : Harié & Léchopiez.
- (54) Nouveaux réactifs de titrage.
- (72) Invention de :
- (33) (32) (31) Priorité conventionnelle : Demande de brevet déposée aux États-Unis d'Amérique le 10 février 1972, n. 225.342 au nom de David H. Rammier.

La présente invention concerne des nouveaux réactifs de titrage, leurs compositions, des procédés pour leur préparation et leur utilisation pour la détection et la mesure de divers systèmes et/ou composants biologiques. Plus particulièrement, l'invention a pour objet des réactifs nouveaux de titrage qui sont utiles, notamment, pour la détection et la mesure de l'activité enzymatique et de la concentration de divers antigènes et anticorps. Ces réactifs conviennent remarquablement à l'amplification et ils permettent ainsi de détecter des concentrations relativement faibles du composant mesuré.

Le fonctionnement de la présente invention est en général sous forme d'une réaction entre un réactif et un composant qu'on désire détecter et mesurer, par exemple une enzyme, de sorte que le réactif subit une altération chimique et passe à une forme se prêtant facilement à des mesures commodes par des moyens spectrophotométriques. Ainsi, la quantité du réactif chimiquement altéré est directement proportionnelle à la quantité du composant biochimique qu'on désire mesurer.

Lors d'un titrage de l'activité enzymatique, on mélange un réactif approprié formant substrat avec un excès des substances biologiques contenant l'enzyme qu'on désire mesurer. L'enzyme réagit avec le réactif, par exemple par hydrolyse d'un groupe ester convenable, pour donner ainsi un produit qu'on peut traiter conformément à l'invention en vue d'obtenir une quantité équivalente (basée sur la quantité de l'enzyme présente) d'un indicateur fluorescent ou coloré qu'on peut mesurer sans difficulté. Ainsi la concentration du groupe indicateur est équivalente à la concentration du réactif altéré et cette dernière concentration est elle-même fonction de l'activité enzymatique dans le composant inconnu.

On peut effectuer des mesures immunologiques à l'aide des réactifs selon l'invention en procédant comme suit : on associe chimiquement ou on couple le réactif avec un antigène; le composé résultant antigène/réactif est alors ajouté à son anticorps spécifique de manière à saturer les sites de fixation de l'antigène sur l'anticorps. Lors de l'addition de la substance biologique contenant l'antigène qu'on désire mesurer, le composé antigène/réactif est déplacé de l'anticorps par l'antigène contenu dans la substance biologique. On peut alors mesurer le composé antigène/réactif déplacé par un clivage chimique du groupe indi-

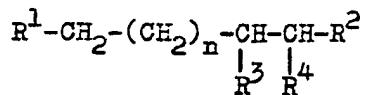
cateur. La quantité clivée est donc proportionnelle à la quantité d'antigène dans la substance biologique capable de déplacer le composé antigène/réactif.

De façon analogue, on peut mesurer l'anticorps en utilisant des composés réactif/anticorps.

En variante, le réactif peut être fixé sur l'anticorps de manière à ne pas bloquer ses sites de fixation de l'antigène. On ajoute alors de l'antigène et on prépare un complexe antigène/anticorps. On élimine par des procédés convenables l'anticorps non réactif résiduel et le reliquat du complexe anticorps/réactif/antigène constitue une mesure de la quantité présente d'antigène. On peut estimer cette quantité par un clivage convenable du groupe indicateur dont la quantité est proportionnelle à celle du complexe anticorps/réactif/antigène.

15 15 La quantité d'un periodate dans un système capable de libérer une quantité mesurable d'un indicateur à partir d'un réactif approprié fournit une détermination directe de la concentration de periodate.

Le procédé par lequel on mesure le réactif altéré constitue le premier aspect qui est aussi l'aspect principal de l'invention. Suivant cet aspect de l'invention, on utilise un procédé selon lequel on traite un composé répondant à la formule :



25

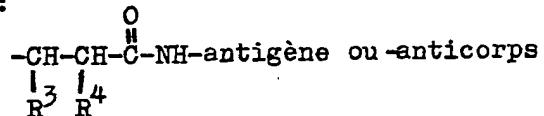
(A)

dans laquelle n est 0 ou 1; R^1 représente un groupe indicateur; R^2 est un atome d'hydrogène ou un anticorps ou antigène couplé; R^3 est un radical hydroxy; et R^4 est un groupe hydroxy, amino ou mercapto, avec un agent oxydant capable de cliver la liaison des atomes de carbone portant les substituants R^3 et R^4 , puis on élimine le groupe indicateur (R^1).

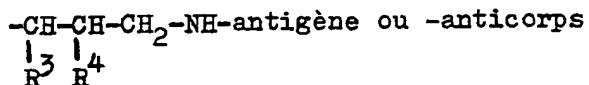
Dans le présent mémoire, l'expression "groupe indicateur" désigne un groupe qui, sous sa forme libre, lors de son dégagement du composé progéniteur, est fluorescent et/ou émet des vibrations électromagnétiques dans les longueurs d'ondes du spectre visible, c'est-à-dire entre 300 et 800 millimicrons environ ou qui est un radio-isotope. Cette expression englobe les indicateurs usuels et notamment les groupes chromophores et fluorophores connus de l'homme de l'art. Des groupes représentatifs sont

les suivants : p-nitrophénoxy, o,p-dinitrophénoxy, fluorescéine, méthoxyfluorescéine, o-amino-benzoate et coumarines. On peut également utiliser des phénols ou des composés aromatiques iodés avec I¹²⁵ ou marqués avec du carbone C¹⁴. Des groupes indicateurs préférés sont les suivants : p-nitrophénoxy, o,p-dinitrophénoxy, fluorescéine, méthoxyfluorescéine, les coumarines et le groupe 2,4-diido(I¹²⁵)-phénoxy.

Dans le présent mémoire, l'expression "anticorps ou antigène couplé" doit être comprise comme englobant un "groupe anticorps ou antigène" en même temps qu'un moyen de couplage avec l'atome terminal de carbone de la chaîne de squelette du réactif, que ce moyen soit une liaison chimique directe ou un groupe spécifique de couplage. Les groupes appropriés de couplage comprennent les groupes ester ou amido de formule partielle (voir formule A ci-dessus) :



ou des groupes amine de formule partielle (voir formule A ci-dessus) :



L'expression "groupe anticorps ou antigène" est définie dans le présent contexte, dans le cas des antigènes, comme des substances biologiques telles que des hormones, l'insuline, des stéroïdes ou des peptides, par exemple la testostérone ou la gonadotropine chorionique, et aussi de petits antigènes tels que des médicaments, par exemple des opiacés et certaines bactéries telles que la gonorrhée (*Neisseria gonorrhoeae*). Dans le cas des anticorps, sont compris également les anticorps naturels du sang tels que ceux correspondant à certains virus, par exemple à l'hépatite, et ceux correspondant à certaines bactéries, par exemple au bacille de la tuberculose.

L'oxydation et l'élimination peuvent être effectuées simultanément ou en deux stades séparés. Pour l'oxydation, on utilise des oxydants appropriés tels que le métaperiodate de sodium et ses composants oxydants métastables; le tétraacétate de plomb et certains bismuthates comme le bismuthate de sodium. On préfère l'ion periodate sous forme d'un sel soluble, par exemple de sel

sodique, potassique ou d'un sel d'amine.

On effectue l'élimination à l'aide des réactifs basiques appropriés qui peuvent être, en présence de l'agent d'oxydation, des amines aliphatiques primaires ou secondaires, par exemple la méthylamine, l'éthylamine, la cyclohexylamine, la diéthylamine, etc, ou certaines amines aromatiques telles que l'aniline. On peut utiliser d'autres bases telles que les hydroxydes, carbonates ou bicarbonates de sodium ou de potassium.

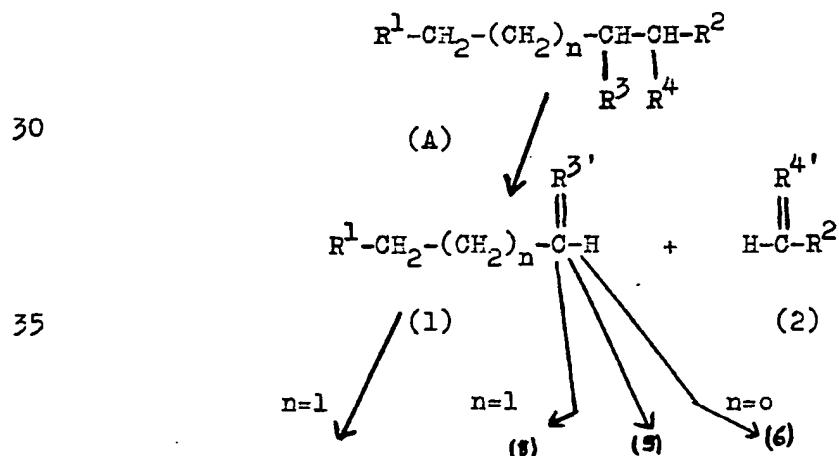
Un procédé efficace par lequel on peut effectuer l'oxydation et l'élimination en un seul stade (élimination par oxydation) consiste à traiter le réactif avec un excès d'un agent oxydant en même temps qu'avec l'une des bases énumérées ci-dessus.

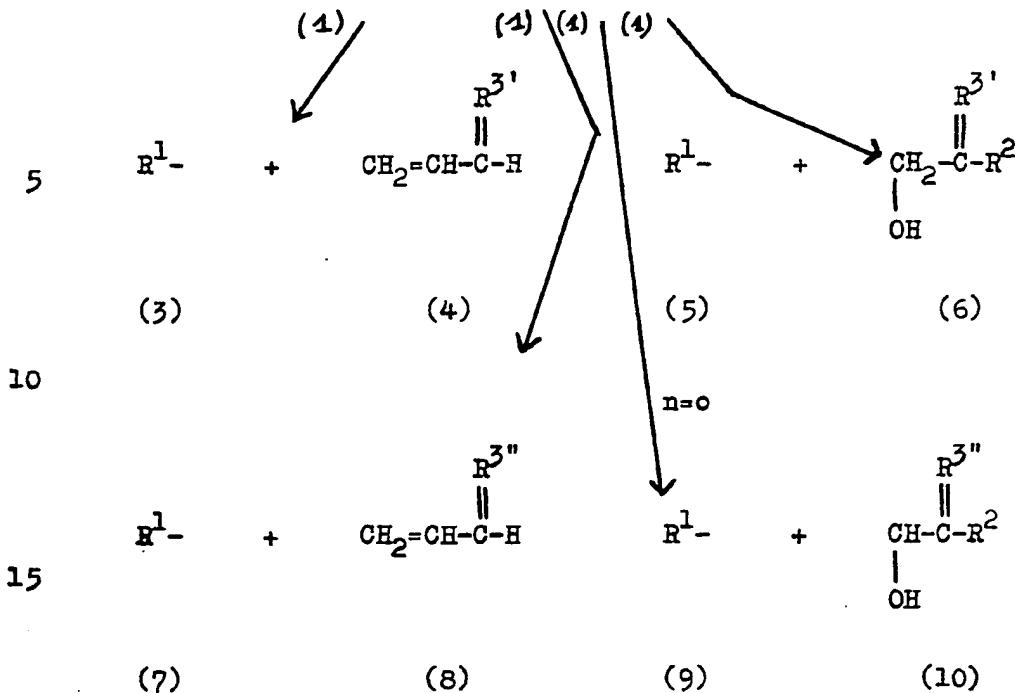
On conduit les réactions d'oxydation et d'élimination d'une façon comme quelleconque, à des températures comprises entre 5 à 100°C environ et pendant une durée de 1 à 25 minutes environ.

La réaction consomme les corps en réaction à raison de 1 mole de l'agent oxydant par mole de substrat mais, lorsqu'on utilise une amine, on utilise une quantité plus grande d'agent oxydant. Bien que les réactions puissent être effectuées avec des proportions quelconques des corps en réaction, on préfère utiliser de 5 à 10 moles environ d'agent oxydant et de 10 à 100 moles environ de base par mole du réactif approprié.

Le procédé selon ce premier aspect de l'invention peut également être illustré et décrit comme suit (séquence A) :

Séquence A



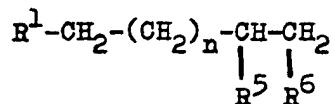


20 dans laquelle R^1 , R^2 , R^3 , R^4 et n sont tels que définis précédem-
ment; R^3' représente un groupe oxo; R^4' représente un groupe oxo, imino ou thioxo; et R^3'' est un groupe imino.

25 Dans la séquence A, on traite un composé de formule A avec un agent oxydant tel qu'un periodate de la façon décrite précédem-
ment et on obtient des composés (1) et (2). Quand on traite (1) avec une base forte, par exemple l'hydroxyde de sodium, les groupes indicateurs (3) et (5) sont éliminés.

30 En variante, on traite un composé (1) avec une amine en présence d'un agent oxydant et on obtient (7) et (8) ou (9) et (10) si la solution est légèrement basique.

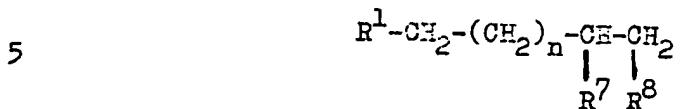
35 Suivant un second aspect de l'invention, cette dernière concerne un procédé permettant des mesures d'enzymes ou la détection et la mesure de l'activité enzymatique (hydrolytique). Ce procédé comprend l'hydrolyse d'un composé de formule :



(B)

40 dans laquelle n et R^1 sont tels que définis plus haut; R^5 est un groupe hydroxy ou un groupe hydrolysable par voie enzymatique; et R^6 est un groupe hydroxy, amino, mercapto ou un groupe hydrolysable.

ble par voie enzymatique, l'un au moins des groupes R⁵ et R⁶ étant un tel groupe hydrolysable par voie enzymatique, avec une enzyme convertible pour donner un composé de formule :



(c)

dans laquelle n et R¹ sont tels que définis plus haut: R⁷ est un groupe hydroxy et R⁸ est un groupe hydroxy, amino ou mercapto; et le traitement d'un composé de formule (C) ainsi obtenu avec un agent oxydant capable de cliver la liaison des atomes de carbone portant les substituants R⁷ et R⁸, suivi de l'élimination du groupe indicateur (R¹).

Dans le présent mémoire, l'expression "groupe hydrolysable par voie enzymatique" désigne un groupe qui peut être clivé (hydrolysé) par des enzymes hydrolytiques, telles que les phosphomonoestérases, sulfatascs, estérases, peptitases, protéinases, carbohydrases et uréases alcalines ou acides. En général, ces groupes hydrolysables par voie enzymatique peuvent être choisis 20 parmi les suivants :

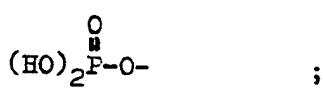
1) des esters notamment les phosphomonoesters et phosphodiesters de l'acide phosphorique, les esters aliphatiques, aromatiques et aralkyliques d'acides carboxyliques et les mono- et diesters de l'acide sulfurique, ainsi que les esters de substances réduites comme les phosphites et les sulfinites:

2) des amides, notamment les amides d'acides aliphatiques, aromatiques, aralkyliques, aminés, peptidiques et protéiniques et les amides d'acides minéraux tels que les acides phosphoramidiques; et

30 3) des glycosides, notamment les glycosides de pentoses et d'hexoses.

Parmi les groupes hydrolysables par voie enzymatique, les suivants sont particulièrement utiles :

Dans la série des esters, le phosphomonoester de formu-



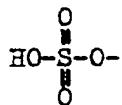
les esters carboxyliques de formule :



40

dans laquelle R¹ est un radical alkyle de 1 à 18 atomes de carbone, de préférence à chaîne droite ou un fragment acide aminé tel que la glycine, la lycine, la phénylalanine et similaires; et le monoester de l'acide sulfurique de formule :

5



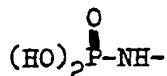
Dans la série des amides, les acides organiques de formule :

10



dans laquelle R'' est un fragment acide aminé, par exemple l'un de ceux énumérés à propos de la formule précédente, ou un fragment peptide tel que leucylleucine ou glycyllysine ou encore des tri-, 15 tétra- ou penta-peptides plus importants et l'amide minéral de la formule suivante, utile pour des phosphoroamidases :

15



Dans les cas où deux groupes hydrolysables par voie enzymatique sont présents, ils peuvent être différents mais on préfère qu'ils soient identiques, du moment que chacun est susceptible d'une hydrolyse enzymatique. D'autre part, un seul composé ester peut être présent, par exemple un phosphodiester, qui doit être hydrolysé en deux stades par deux enzymes différentes, d'abord une diestérase et ensuite une phosphomonoestérase. Cette 25 flexibilité permet de détecter et de mesurer une enzyme ou deux enzymes différentes dans un système biologique.

Le choix de l'enzyme particulière qui est capable d'hydrolyser un groupe donné hydrolysable par voie enzymatique est en 30 général à la portée de l'homme de l'art. Par exemple, les phosphomonoestérases alcalines et acides sont hydrolytiques vis-à-vis de divers esters et amides d'acides du phosphore qui sont hydrolysables par voie enzymatique. De même les estérases sont hydrolytiques vis-à-vis des divers esters d'acides carboxyliques, les 35 sulfatasées sont hydrolytiques vis-à-vis des divers esters d'acide sulfurique, les enzymes protéiques sont hydrolytiques vis-à-vis de groupes ester ou amide et enfin les uréases sont hydrolytiques vis-à-vis des groupes d'urée substituée.

Ces enzymes hydrolytiques sont présentes et peuvent être 40 détectées et mesurées dans divers fluides biologiques, tels que

le sérum, l'urine et le sang et dans des matières biologiques, telles que les tissus, les cellules (de mammifères, de protozoaires, de plantes et de bactéries) et dans des extraits de telles matières. En général, on peut utiliser les réactifs avec une source quelconque de matière ayant une activité enzymatique et pouvant utiliser les composés considérés comme substrats lors de la détection et de la mesure de l'activité enzymatique.

Selon cet aspect de l'invention, on met en contact un réactif choisi parmi ceux représentés par la formule (B) ci-dessus avec une substance biologique ayant une activité enzymatique et on prépare ainsi le dérivé hydrolysé de ce composé (B), c'est-à-dire le composé (C), on oxyde ledit dérivé hydrolysé (C) et finalement on hydrolyse le groupe indicateur comme expliqué précédemment.

On peut effectuer l'hydrolyse d'une façon commode quelconque à des températures comprises entre 20 et 40°C environ, pendant une durée de 1 minute à 24 heures environ et à un pH et une concentration en sel appropriés pour l'activité enzymatique. Pour des titrages longs, on maintient habituellement le pH entre 7 et 8 environ.

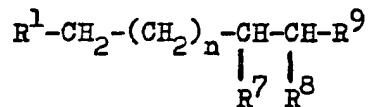
On mesure l'intensité du groupe indicateur libre par voie spectrophotométrique ou radiographique pour déterminer le degré ou l'importance de l'activité enzymatique (hydrolyse) réalisée. Ainsi le degré de l'activité enzymatique ressort à l'examen du degré d'hydrolyse du groupe hydrolysable par voie enzymatique et ce dernier est mesuré par l'intensité du rayonnement (électromagnétique ou isotopique) du groupe indicateur qui est enlevé ou clivé uniquement de la portion du réactif (B) qui a été hydrolysée par voie enzymatique, c'est-à-dire du composé (C).

En utilisant des portions normalisées de matière biologique et une mesure mathématiquement équivalente du groupe indicateur, on peut calculer le niveau relatif de l'activité détectée et mesurée de l'enzyme. Cette détermination des niveaux d'activité enzymatique dans un organisme donné est utile du point de vue clinique pour diagnostiquer des états ou des maladies qui provoquent et reflètent un équilibre incorrect des niveaux enzymatiques.

Par exemple, les taux de certaines enzymes dans le sérum, qui sont au-dessus ou au-dessous des valeurs normales, indiquent fréquemment des affections ou des maladies graves telles

que des maladies hépatiques, du myocarde, du pancréas et de la prostate. Ainsi, dans le cas de taux accrus des phosphatases alcalines, on peut diagnostiquer une jaunisse obstructive, une cirrhose biliaire et une hépatite cholangiolitique; dans les cas de 5 taux réduits des phosphatases alcalines, on peut diagnostiquer une hypophosphatasie et une alimentation défectiveuse. De même, des taux accrus de phosphate acide peuvent indiquer cliniquement le carcinome de la prostate et des métastases correspondantes. Connaître le rapport entre les lipases et les amylases dans le 10 serum est utile pour le praticien afin de diagnostiquer diverses maladies du pancréas. Une étude des taux de CPK, GOT, LDH et GPT dans le serum a une utilité directe dans l'indication de l'infarctus du myocarde. Le nombre des utilisations pour les diagnostics médicaux est important et ces utilisations sont étudiées 15 dans des manuels courants de médecine clinique.

Suivant un troisième aspect de l'invention, cette dernière a pour objet un procédé utile pour les mesures immunologiques, par exemple la détection et la mesure de divers antigènes et anticorps. Un tel procédé comprend le traitement d'un composé 20 de formule :



(D)

25 dans laquelle R^1 , R^7 , R^8 et n sont tels que définis précédemment et R^9 est un anticorps ou antigène couplé tel que défini plus haut, avec un agent oxydant capable de cliver la liaison des atomes de carbone portant les substituants R^7 et R^8 , suivi de l'élimination du groupe indicateur (R^1). On conduit les réactions d'oxydation et d'élimination de la même façon que précédemment.

Les mesures immunologiques qui utilisent ce procédé peuvent se faire de plusieurs manières. Suivant un mode de mise en œuvre de ce procédé, on laisse le complexe antigène/réactif se fixer aux sites de liaison sur son anticorps. On mélange avec ce 35 complexe antigène/réactif l'échantillon de fluide biologique contenant l'antigène qu'on désire mesurer. On mesure indirectement la quantité d'antigène dans le fluide biologique en déterminant la quantité du complexe antigène/réactif déplacée par l'antigène de l'anticorps. On détermine ce réactif à l'aide de son indicateur après le traitement, comme décrit plus haut.

Une autre technique plus directe consiste à laisser l'anticorps réagir avec le fluide biologique contenant l'antigène à mesurer. Après saturation de l'anticorps avec l'antigène inconnu, on ajoute le complexe antigène/réactif. Les sites de liaison qui 5 n'ont pas été utilisés par l'antigène inconnu sont repris par le complexe réactif/antigène. La quantité de ce complexe antigène/réactif qui se lie avec l'anticorps en l'absence du composant inconnu, diminuée de la quantité qui se lie après réaction avec le composant inconnu, représente la quantité d'antigène présente 10 dans le composant inconnu. Dans ce cas encore, le complexe antigène/réactif est déterminé au cours d'une réaction chimique ultérieure comme on l'a expliqué précédemment.

On peut également "marquer" l'anticorps avec le réactif. On sature l'anticorps avec l'antigène inconnu. L'anticorps qui 15 n'est pas saturé d'antigène est enlevé de la réaction par absorption sur un support antigène/matrice solide. Il ne reste ainsi que le complexe réactif/anticorps avec l'antigène inconnu en solution. On détermine cette substance par le procédé chimique décrit précédemment.

- 20 Dans ce procédé, on immobilise un anticorps ou un antigène sur une matrice solide de support. Les polymères servant de supports ou de véhicules peuvent être choisis parmi ceux qui sont capables d'absorber physiquement l'anticorps ou l'antigène, par exemple le charbon de bois, les argiles et les perles de verre.
- 25 On peut choisir d'autres véhicules du type polymère qui réalisent le couplage chimique de l'anticorps ou de l'antigène, par exemple des dérivés de polyvinyl-benzène, des arylamines, des acides carboxyliques, des acides sulfoniques; des dérivés de polyéthylène comme des acides polyacryliques; la cellulose et ses dérivés; la 30 fibrofne; la laine; des polypeptides; des protéines précipitées et le stroma des cellules sanguines rouges. D'autres substances peuvent également servir de véhicules et notamment des protéines et certaines matières emprisonnées dans une matrice d'un polymère organique. On effectue l'immobilisation de l'anticorps ou de l'antigène par des procédés connus, par exemple le couplage par l'intermédiaire d'une liaison azofique, d'un groupe isothiocyanate ou par une absorption non spécifique, comme décrit par exemple par Axen et ses Collaborateurs dans Acta. Chem. Scand. 18, N° 9, 2193 (1964); Axen et ses Collaborateurs dans Nature, 210, 367 35 (1966); Gurevich et ses Collaborateurs, dans Biokhimiya, 26, N° 5,

934 (1961); Onove et ses Collaborateurs dans Immunochemistry, Pergamon Press, 2, 181 (1965); Surinov et ses Collaborateurs, dans Biokhimiya, 31, № 2, 387 (1966); Weliky et ses Collaborateurs, dans Immunochemistry, Pergamon Press, 2, 325 (1965), et les références citées dans ces différents ouvrages, qui sont incorporées ici par référence.

De cette façon, un véhicule est formé et comprend de l'anticorps ou de l'antigène combiné dans une proportion calculable par rapport à une capacité connue de liaison. Une fois que l'im-
10 mobilisation a eu lieu, on fait passer à travers la matrice un échantillon d'essai inconnu contenant un antigène (ou un anticorps) spécifique pour l'anticorps (ou l'antigène) immobilisé. L'antigène (ou l'anticorps) contenu dans l'échantillon forme un complexe avec l'anticorps (ou l'antigène) complémentaire immobi-
15 lisé sur la matrice.

On met alors en contact avec la matrice ainsi traitée une quantité prédéterminée d'un composé de formule (D) dans laquelle R⁹ est l'antigène (ou l'anticorps) spécifique à l'anticorps (ou à l'antigène) immobilisé ou, en d'autres termes, identique à l'antigène (ou anticorps) contenu dans l'échantillon inconnu. On utilise ainsi les sites restants non liés sur la matrice pour former un complexe avec une fraction du composé de formule (D) et on peut récupérer la fraction restante du composé (D) et la mesurer par spectrophotométrie comme décrit précédemment.
25 Un calcul simple en partant des données connues, qui sont la capacité de liaison de la matrice, la quantité du réactif (composé (D) et la quantité récupérée (non complexée), permet alors de déterminer la quantité d'antigène (ou d'anticorps) dans l'échantillon inconnu. La quantité du groupe indicateur mesurée est fonction de la quantité de l'antigène (ou de l'anticorps) soumis à l'essai.

Ainsi, pour donner un exemple simple, si quatre molécules d'anticorps sont immobilisées sur une matrice et sont traitées avec un échantillon (par exemple de l'urine) contenant trois antigènes spécifiques pour lesdits anticorps, il demeure un site d'anticorps. On met alors en contact avec la matrice traitée cinq molécules d'un composé de formule (D) dans laquelle R⁹ est le même antigène spécifique que celui présent dans l'échantillon. Une molécule se lie avec le site restant et quatre autres molécules, 40 une fois qu'elles ont subi le traitement décrit, fournissent qua-

tre groupes indicateurs dont on compare les intensités. Un calcul simple, c'est-à-dire $4-(5-4)=3$, permet de déterminer la concentration de l'antigène dans l'échantillon.

Un autre procédé de mesure immuno-chimique utilise une quantité connue d'un complexe d'un composé de formule (D) avec un anticorps (ou antigène) spécifique pour l'antigène (ou l'anticorps) du groupe R⁹ du composé utilisé. On met en contact un échantillon contenant une concentration inconnue de l'antigène (ou anticorps) identique au groupe R⁹ avec ledit complexe de façon que l'antigène (ou l'anticorps) de l'échantillon déplace le composé (D). La matière déplacée est alors traitée et mesurée de façon comparative comme il a été expliqué et on obtient ainsi une détermination directe de la concentration inconnue de l'antigène (ou de l'anticorps).

Ainsi, pour donner un exemple simple, si cinq molécules d'un complexe d'anticorps spécifique à la morphine avec un composé de formule (D), dans lequel R⁹ est un résidu de morphine, sont mises en contact avec un échantillon, par exemple un échantillon d'urine, contenant quatre molécules de morphine, la morphine de l'urine déplace quatre molécules du composé (D) et, après traitement et mesure comparative comme décrit plus haut, on obtient une détermination directe de la concentration de morphine dans l'échantillon.

Des mesures similaires, par exemple pour détecter la gona-25 nadotropine chorionique, fournissent un diagnostic simple, direct et précis de grossesse chez la femme.

Les matières contenant des concentrations inconnues d'anticorps ou d'antigènes peuvent provenir de sources très variées. Par exemple, on peut soumettre aux essais divers fluides biologiques tels que ceux qui ont été mentionnés pour déterminer la présence de certaines substances spécifiques. En règle générale, les réactifs selon l'invention peuvent être utilisés avec des matières d'une provenance quelconque contenant un anticorps ou antigène spécifique et peuvent utiliser ces composés ou substrats pour détecter et mesurer lesdits anticorps et/ou antigènes.

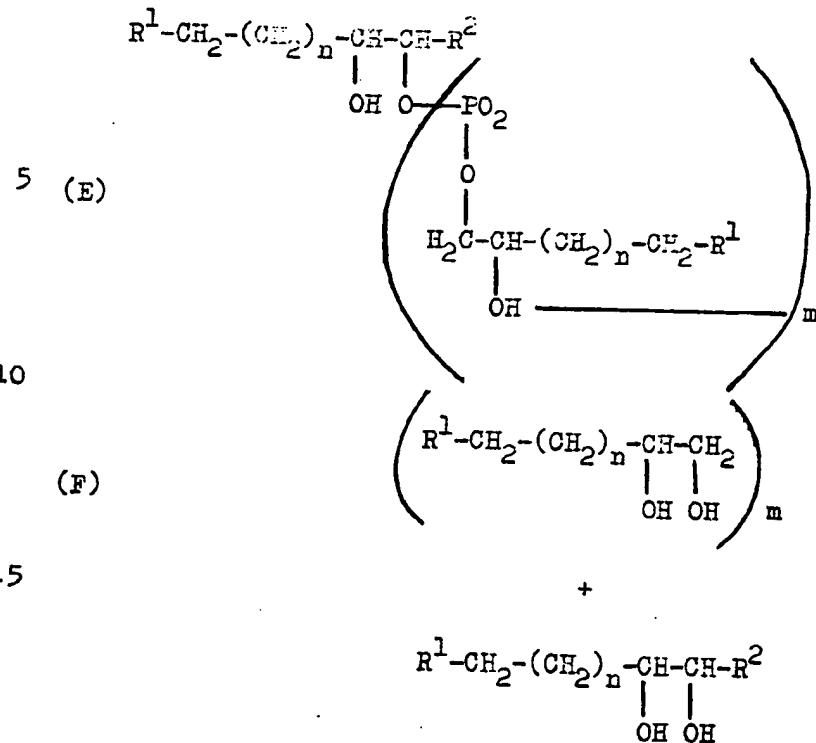
Les réactifs et le procédé selon l'invention sont également utiles pour détecter et mesurer les concentrations de périodes dans un système donné. Par la mise en contact d'une quantité connue d'un composé de formule (A) avec un périodate inconnu, 40 opération qu'on fait suivre d'une élimination du groupe indica-

teur, tel que défini plus haut, on obtient une mesure directe de la concentration du periodate. L'utilité de ce procédé découle de la précision de la mesure du periodate non utilisé et, par conséquent, du periodate utilisé dans un système dans lequel le periodate sert de réactif, par exemple dans la détection de la concentration dans le glycol de matières biologiques contenant des hydrates de carbone ou des hydrates de carbone eux-mêmes.

Les réactifs et le procédé selon l'invention sont également utiles pour mesurer l'activité oxydante des enzymes, par exemple de la déshydrogénase alcoolique dans un système donné.

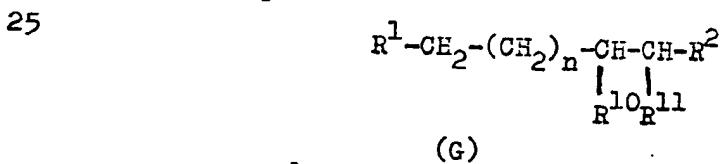
Dans un tel procédé, on met en contact un composé de formule (A), dans lequel R³ et R⁴ sont des groupes hydroxy et R² est un atome d'hydrogène, avec une enzyme oxydante inconnue de manière à préparer le composé à groupes terminaux aldéhyde correspondant. L'élimination du groupe indicateur, comme décrit ci-dessus, du fragment aldéhyde ainsi préparé fournit une mesure directe de la concentration de l'enzyme. Ces enzymes sont biologiquement utiles et des variations de leurs concentrations peuvent indiquer certains troubles du métabolisme, par exemple des maladies du foie.

Comme on l'a dit plus haut, les réactifs selon l'invention conviennent remarquablement pour l'amplification, c'est-à-dire que l'on peut mesurer des concentrations minimes d'une matière inconnue. Pour donner un exemple, on peut lier ensemble des composés multiples de formule (B) à l'aide de groupes ester difonctionnels (R⁵ et/ou R⁶). Un nombre de molécules d'enzymes hydrolytiques aussi faible que deux peut cliver chaque liaison d'ester en libérant les diverses molécules du composé (C) qu'on peut traiter de la façon décrite. On dispose ainsi d'un moyen par lequel on peut détecter de faibles concentrations d'un anticorps ou d'un antigène et mesurer ces concentrations par spectrophotométrie. C'est ainsi qu'on peut préparer un composé de formule (E) ci-dessous et le traiter avec une phosphodiestérase et une phosphomonoestérase non spécifiques pour obtenir les composés de formule (F) ci-dessous qu'on peut traiter de la façon décrite pour obtenir ainsi les groupes indicateurs (R¹) qu'on mesure par voie spectrophotométrique.



20 formules dans lesquelles m est un nombre entier positif.

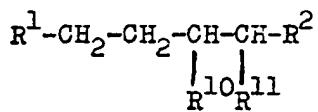
Selon un quatrième aspect de l'invention, cette dernière a pour objet des composés nouveaux choisis parmi ceux des formules (A), (B), (C) et (D) ci-dessus, comme représenté par la formule (G) ci-après :



dans laquelle R^1 est un groupe indicateur; n est 0 ou 1; R^2 est
 30 un atome d'hydrogène ou un anticorps ou antigène couplé; R^{10} est un groupe hydroxy ou un groupe enzymatique hydrolysable; et R^{11} est un groupe hydroxy, amino, mercapto ou un groupe hydrolysable par voie enzymatique, avec la condition que lorsque R^2 est un atome d'hydrogène et que R^{10} et R^{11} sont tous deux des groupes au-
 35 tres que des groupes hydrolysables par voie enzymatique, n doit être 1. Parmi les composés nouveaux de formule (G), on préfère ceux dans lesquels $n = 1$, ceux dans lesquels R^1 est un groupe 4-nitrophényloxy ou 2,4-dinitrophényloxy ou un groupe fluorescéine ou méthoxyfluorescéine, ceux dans lesquels R^{10} et R^{11} sont tous 40 deux des groupes hydroxy et ceux dans lesquels R^2 est un atome

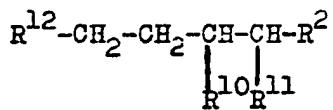
d'hydrogène, c'est-à-dire les composés répondant aux formules respectives suivantes :

5



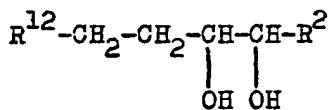
(H)

10



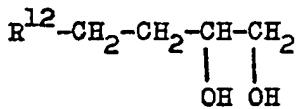
(I)

15



(J)

20



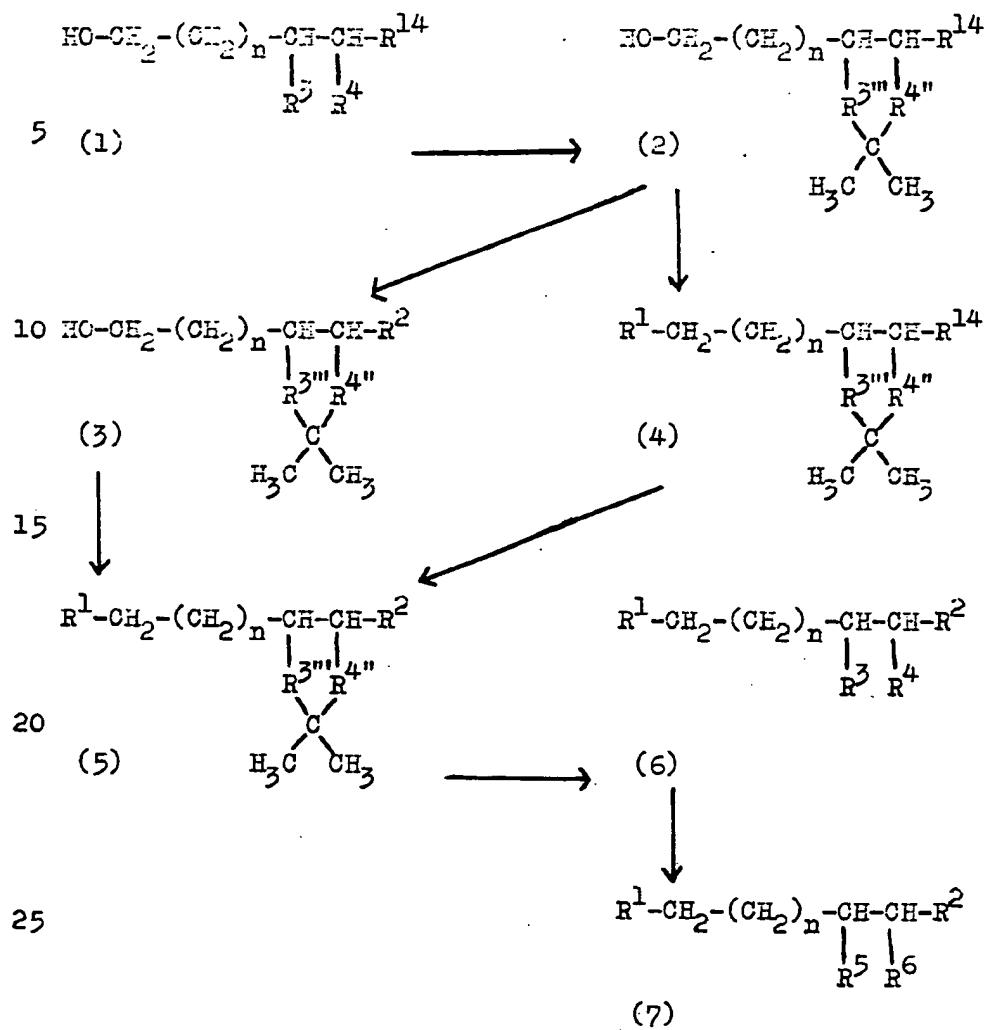
(K)

25 dans lesquelles R^{12} est un groupe 4-nitrophényloxy, 2,4-dinitro-phényloxy, fluorescéine ou méthoxy-fluorescéine. On préfère particulièrement les composés de formules (I), (J) et (K) dans les-
 quelles R^{12} est le groupe 4-nitrophényloxy et ceux de formule (H)
 dans laquelle R^1 est le groupe 4-nitrophényloxy.

30 On peut préparer commodément les réactifs dans un système tamponné stable par des procédés classiques connus de l'homme de l'art. Parmi les systèmes de tamponnement à un pH stable, on citera l'acétate de sodium (0,1 M, pH 4,5), le phosphate de sodium (0,1 M, pH 7,5), le chlorhydrate de triéthanolamine (0,1 M, pH 8,5) etc. Les tampons qui consomment des periodates, tels que le 35 tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane, sont à éviter.

Les composés selon l'invention sont préparés suivant la séquence de réactions B :

Séquence B.



dans laquelle n , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 et R^6 sont tels que définis plus haut, $R^{3''}$ est un groupe oxy, $R^{4''}$ est un groupe oxy, s-amino ou thio et R^{14} est un atome d'hydrogène ou un anticorps ou antigène couplé.

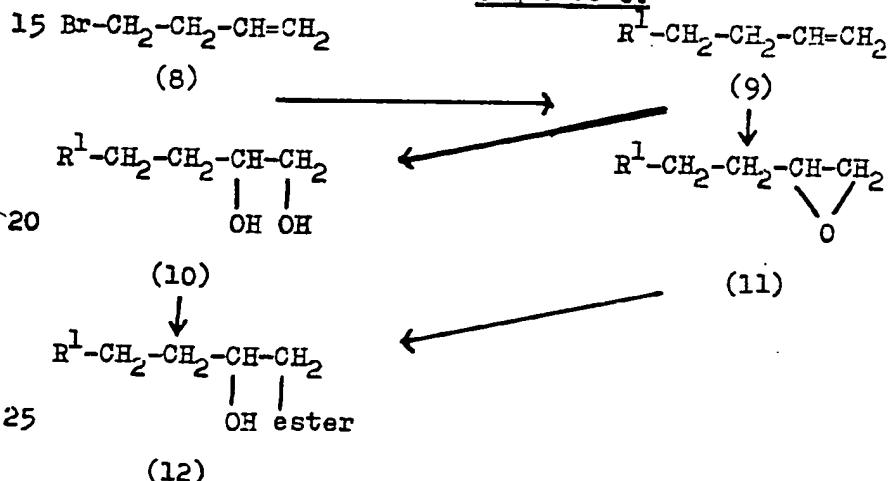
En se référant à cette séquence, on prépare l'acétal de protection (2) du composé (1) par la réaction avec du 2,2-diméthoxypropane, comme décrit dans J. Amer. Chem. Soc. 83, 756 (1951) et J. Org. Chem. 26, 2863 (1961). On fait réagir éventuellement le composé (2) avec un groupe réactif d'anticorps ou d'antigène approprié pour former les composés de formule (3) dans laquelle R² est un anticorps ou un antigène couplé. On fait réagir le groupe hydroxy libre du composé (3) avec l'halogénure indiquée

teur désiré en présence d'une amine tertiaire telle que la triéthylamine, la pyridine ou similaire, selon le procédé usuel décrit par Wagner et Zook, Synthetic Organic Chemistry, John Wiley and Son, New York, 1953, page 227 et les références citées dans cet ouvrage, pour obtenir ainsi le composé (5). On hydrolyse ensuite ce composé avec un acide pour cliver le groupe acétal et former des composés (6) qu'on transforme en composés (7) par une estérification usuelle.

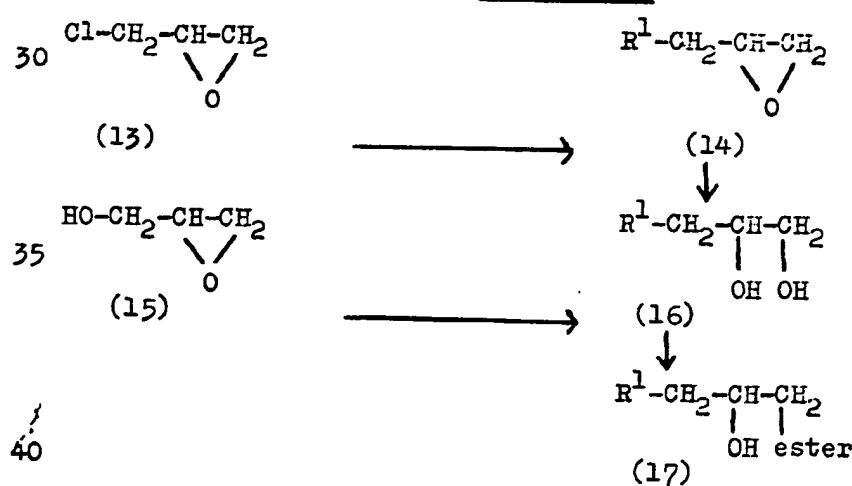
En variante, on peut introduire le groupe indicateur R¹ (composé 4) avant l'introduction du groupe anticorps ou antigène (composé 5).

En variante, on prépare certains des composés selon l'invention par les séquences suivantes de réaction :

Séquence C.



Séquence D.



dans lesquelles R¹ est tel que défini plus haut et "ester" désigne un ester hydrolysable par voie enzymatique comme expliqué ci-dessus.

Dans le cas de la séquence C, on ajoute un groupe indicateur en remplacement du groupe bromo sur le 4-bromo-1-butène pour obtenir le composé (9). Par traitement de ce composé avec de l'acide performique, on prépare le 1,2-butanediol correspondant (10) qu'on estérifie par les mêmes procédés que précédemment pour obtenir le produit (12). En variante, on peut traiter le 1,2-butène (9) avec de l'acide m-chloroperbenzoïque pour former ainsi le 1,2-époxyde correspondant (11), après quoi on ouvre l'époxyde avec un anion ester pour préparer les composés (12) correspondants.

Dans le cas de la séquence (D), on fait réagir l'épi-chlorhydrine (13) de la façon décrite pour introduire R¹, puis on traite avec une base et on fait réagir avec de l'hydroxyde de sodium aqueux pour obtenir le 1,2-époxy-propane correspondant (14). On peut hydrolyser l'époxyde de ce composé avec un acide dilué pour obtenir le diol correspondant (16) qu'on peut estérifier comme indiqué pour préparer les monoesters primaires (17).

En variante, on ouvre le noyau du glycidol (15) avec un réactif indicateur de la façon décrite, dans une base, et on obtient le 1,2-propanediol correspondant (16) qu'on estérifie en composé (17) de la façon décrite.

On peut préparer certains des composés de formule (5) par le procédé de Petrov et ses Collaborateurs, J. Pharmacy and Pharmacology 5, 359 (1953). Ce procédé consiste à former un époxyde contenant un groupe indicateur et à traiter ce dernier avec une solution d'hydroxyde d'ammonium dans de l'éthanol aqueux pour obtenir des composés hydroxy-amino vicinaux. On estérifie ensuite ces composés comme décrit précédemment.

Les exemples suivants servent à illustrer l'invention sans aucunement en limiter la portée.

La série suivante d'exemples illustre le procédé par lequel on prépare les composés selon l'invention.

EXEMPLE 1.

On agite à 100°C pendant 17 heures un mélange de 82,3 g (0,5 M) de 4-nitrophénol, de 137 g (1,8 M) d'épichlorhydrine et de 5 ml de pipéridène. On évapore la solution et on ajoute au résidu 2 moles d'hydroxyde de sodium dans 500 ml d'eau. Après 24

heures d'agitation, on traite la solution par extraction au chloroforme. Après lavage avec de l'hydroxyde de sodium dilué, on évapore la solution chloroformique séchée et on obtient ainsi du β -(4-nitrophényloxy)-1,2-époxypropane. On chauffe à 90°C pendant 5 5 heures une solution de 1,0 g de cet époxyde dans 15 ml d'acide acétique aqueux à 50 %, puis on évapore et on chromatographie sur des plaques d'acide silicique (rapport chloroforme/étherol = 9:1). On élue la bande avec un R_f d'environ 0,5 et on cristallise à partir d'un mélange de chloroforme et d'acétate d'éthyle pour obtenir ainsi du 1,2-dihydroxy- β -(4-nitrophényloxy)propane.

EXEMPLE 2.

À un mélange de 1,16 g (15,6 ml) de 2,3-époxypropanol, de 10 ml de méthanol anhydre et de 1,0 g de méthylate de sodium, on ajoute 2,6 g (19 ml) de 4-nitrophénol. Après 5 heures de chauffage au reflux, on évapore le solvant et on chromatographie le résidu sur des plaques d'acide silicique en utilisant un mélange (9:1) de chloroforme et de méthanol et on obtient du 1,2-dihydroxy- β -(4-nitrophényloxy)-propane qu'on peut cristalliser à partir d'un mélange de chloroforme et d'acétate d'éthyle. De façon analogue, on prépare le 1,2-dihydroxy-4-(4-nitrophényloxy)-butane.

En remplaçant le réactif indiqué par chacun de ceux qui sont énumérés dans la Colonne A, on prépare les composés indiqués dans la Colonne B.

	<u>Colonne A.</u>	<u>Colonne B.</u>
25	2,4-dinitrophénol	1,2-dihydroxy- β -(2,4-dinitrophényloxy)-propane
30	4-nitrophénol	1,2-dihydroxy-4-(2,4-dinitrophényloxy)-butane
		1,2-dihydroxy- β -(4-nitrophényloxy)-propane
		1,2-dihydroxy-4-(4-nitrophényloxy)-butane
35	éther monométhylique de fluorescéine	1,2-dihydroxy- β -(éther monométhylique de fluorescéine)-propane
		1,2-dihydroxy-4-(éther monométhylique de fluorescéine)-butane
	7-hydroxy-coumarine	1,2-dihydroxy- β -(7-hydroxy coumarine)-propane

7-hydroxy-coumarine (suite)	1,2-dihydroxy-4-(7-hydroxy coumarine)-butane
2,4-diido ¹²⁵ phénol	1,2-dihydroxy-3-(2,4-diido ¹²⁵ phénol)-propane
5	1,2-dihydroxy-4-(2,4-diido ¹²⁵ phénol)-butane.

EXEMPLE 3.

On chauffe au bain-marie bouillant pendant 90 minutes un mélange de 80 g de 1,2-dihydroxy-3-(4-nitrophényloxy)-propane 10 dans 400 ml d'éthanol et de 400 ml d'une solution d'ammonium (0,880). Après avoir laissé refroidir le mélange, on recueille les matières solides séparées et on concentre un peu les liqueurs-mères pour enlever l'hydroxyde d'ammonium. Après l'addition d'éthanol pour faire disparaître le trouble, on ajoute un volume égal 15 gal d'acide chlorhydrique concentré et on obtient ainsi le chlorhydrate de 1-amino-2-hydroxy-3-(4'-nitrophényloxy)-propane qu'on peut purifier à partir d'un mélange d'acétate d'éthyle et de méthanol. Quand on cristallise les matières solides indiquées à partir d'éthanol aqueux, on obtient du 1-amino-2-hydroxy-3-(4'-nitrophényloxy)-propane.

De façon analogue, on transforme les produits de l'exemple 2 en composés 1-amino correspondants, c'est-à-dire les suivants :

- 25 1-amino-2-hydroxy-3-(4-nitrophényloxy)-propane,
- 1-amino-2-hydroxy-4-(4-nitrophényloxy)-butane,
- 1-amino-2-hydroxy-3-(2,4-dinitrophényloxy)-propane,
- 1-amino-2-hydroxy-4-(2,4-dinitrophényloxy)-butane,
- 1-amino-2-hydroxy-3-(éther monométhylique de fluorescéine)-propane,
- 30 1-amino-2-hydroxy-4-(éther monométhylique de fluorescéine)-butane,
- 1-amino-2-hydroxy-3-(7-hydroxy coumarine)-propane,
- 1-amino-2-hydroxy-4-(7-hydroxy coumarine)-butane,
- 1-amino-2-hydroxy-3-(2,4-diido¹²⁵ phénol)-propane,
- 35 et 1-amino-2-hydroxy-4-(2,4-diido¹²⁵ phénol)-butane.

EXEMPLE 4.

On combine 1,95 g (26,1 mM) de 2,3-oxydopropanol froid redistillé et 4,34 g (25,4 mM) de 2,4-dinitrofluorobenzène avec 740 ml de triéthylamine et on maintient le mélange à la température

ambiante pendant 16 heures. On sépare par filtration la matière solide formée et on la dissout dans un petit volume de chloroforme. On dépose la solution chloroformique en couches sur une colonne d'acide silicique (5 x 50 cm) qu'on développe avec du chloroforme et ensuite avec de l'acétate d'éthyle. On élue le produit 1,2-oxydo-3-(2,4-dinitrophényloxy)-propane avec de l'acétate d'éthyle et on le cristallise à partir d'acétate d'éthyle.

EXEMPLE 5.

On prépare du 3-(2,4-dinitrophényloxy)-1,2-O-isopropylidène-glycérol à partir de 1,2-O-isopropylidène-glycérol en utilisant du dinitrofluorobenzène comme indiqué dans l'exemple 4.

On élimine le groupe isopropylidène par traitement avec de l'acide acétique à 80 % pendant 17 heures à température ambiante. Après élimination de l'acide acétique par évaporation sous pression réduite, on cristallise le résidu huileux à partir de benzène et on obtient du 1,2-dihydroxy-3-(2',4'-dinitrophényloxy)-propane.

De façon analogue, on prépare le 1-amino-2-hydroxy-3-(2'-4'-dinitrophényloxy)-propane et le 1-amino-2-hydroxy-4-(2',4'-dinitrophényloxy)-butane.

EXEMPLE 6.

À une solution de 11 g (56 mM) de 4-nitrophénolate de sodium dans 50 ml de diméthylformamide, on ajoute 5 g (37 mM) de 4-bromo-1-butène. Après 2,5 heures de chauffage à 100°C, on dilue le mélange avec 400 ml d'eau et on le traite par extraction avec de l'éther de pétrole léger. Les extraits éthérés sont traités de nouveau par extraction avec de l'hydroxyde de sodium froid à 5 %, et ensuite lavés à l'eau et séchés sur du sulfate de magnésium. On évapore la solution sous pression réduite, on cristallise l'huile résiduelle à partir d'éther de pétrole à 0°C et on obtient du 4-(4-nitrophénoxy)-1-butène.

À une solution du composé résultant (6,0 g, 3 mM) dans 150 ml de benzène, on ajoute 9,0 g (52 mM) d'acide m-chloroperbenzoïque. On agite pendant 24 heures à 57°C dans l'obscurité. On élimine le solvant et on chromatographie le résidu sur une colonne d'acide silicique (5 x 50 cm) en utilisant du chloroforme qui contient 0,5 % de méthanol comme solvant d'élution pour obtenir du 1,2-oxido-4-(4'-nitrophénoxy)-butane.

EXEMPLE 7.

40 On ajoute 1 ml de peroxyde d'hydrogène (30 %) à un mé-

mélange avec 1,0 g de 4-(4-nitrophén oxy)-1-butène dans 9 ml d'acide formique (98%). Après 4 jours à température ambiante, on porte le pH du mélange de réaction à 9 avec de l'hydroxyde d'ammonium et on s'écoule pour hydrolyser les esters formyliques intermédiaires. On isole le produit en traitant le mélange par extraction au chloroforme, on évapore la solution chloroformique séchée et on obtient une matière solide. La recristallisation à partir d'un petit volume de chloroforme donne le 1,2-dihydroxy-4-(4-nitrophén oxyloxy)-butène. On prépare le 1,2-dihydroxy-4-(4-nitrophén oxyloxy)-butane à partir du 1,2-oxydo-4-(4'-nitrophén oxy)-butane en utilisant les mêmes conditions acides que ci-dessus. On cristallise à partir du chloroforme le diol (produit).

EXEMPLE 8.

À une solution de 1,46 g (10 mM) de 1,2-O-isopropylidène-
nc-4-butanol dans 5 ml de triéthylamine, on ajoute 1,9 g (9,9 mM)
de 2,4-dinitrofluorobenzène. Après 17 heures à température ambiante, on évapore la solution à un petit volume, on la dissout
dans du chloroforme et on la fait passer sur une colonne d'acide silicique (5 x 50 cm). On élue la colonne avec du chloroforme, ce qui donne une huile. On traite l'huile avec de l'acide acétique à 80 % pendant 18 heures à température ambiante. Après élimination de l'acide acétique par évaporation, on chromatographie le résidu sur des plaques d'acide silicique pour préparation (10 % de méthanol dans du chloroforme) en éluant avec du méthanol et on obtient du 1,2-dihydroxy-4-(2,4-dinitrophén oxy)-butane qu'on peut cristalliser à partir d'éther.

Les procédés indiqués peuvent également servir à préparer les produits des exemples 1 à 3.

EXEMPLE 9.

On prépare les composés 1-mercaptop-2-hydroxy qui correspondent à ceux indiqués précédemment en remplaçant les conditions acides dans l'exemple 7 par du sulfate de sodium. On prépare les esters mercapto en faisant réagir les composés 1,2-oxydo avec, par exemple, du thioacétate de sodium.

EXEMPLE 10.

On traite une solution de 5,83 g (0,03 mM) de 1-(4'-nitrophén oxyloxy)-2,3-oxydopropane et de 3,0 g (0,05 mM) de succinimide dans 25 ml d'éthanol avec 3 gouttes de pyridine puis on la chauffe au reflux pendant 4 heures. Quand on refroidit le mélange à 0°C, on constate la séparation d'une huile. On fait revenir à

la température ambiante le mélange refroidi contenant l'huile séparée et on obtient ainsi le 1-(3-(4'-nitrophényloxy)-2-hydroxy-propyl)-succinimide.

On dissout 1,0 g (3,6 mM) du succinimide ainsi préparé 5 dans un mélange de 10 ml d'éthanol à 95 % et de 5 ml d'acide chlorhydrique 12 N. On chauffe la solution au reflux pendant 6 heures et on la laisse au repos pendant toute une nuit. On distille le solvant sous pression réduite et on reprend le résidu dans de l'eau et de l'éther. On sépare la phase aqueuse, on la 10 lave avec de l'éther et on l'évapore à sec. On cristallise le résidu, qui est une matière semi-solide, à partir d'un mélange d'éthanol et d'éther et on obtient ainsi le chlorhydrate de 1-amino-3-(4'-nitrophényloxy)-2-propanol.

On laisse au repos à température ambiante pendant 24 15 heures une solution de 232,5 mg (1,0 mM) de chlorhydrate de 3-(4'-nitrophényloxy)-1-amino-2-propanol, de 420 mg (1,0 mM) de carbobenzoxy-1-phénylalanine et de 297 mg (1,2 mM) de N-carboéthoxy-2-éthoxy-1,2-dihydroquinoléine dans 10 ml de pyridine. On élimine le solvant sous vide et on dissout l'huile résiduelle dans 20 de l'eau et de l'acétate d'éthyle. On élimine la phase aqueuse et on lave la solution dans l'acétate d'éthyle à deux reprises avec de l'acide chlorhydrique normal, à deux reprises avec du carbonate de sodium 1 M et enfin une fois avec une solution saturée de chlorure de sodium. On évapore sous vide la solution dans l'acé- 25 tate d'éthyle et on ajoute à la matière résiduelle 2 ml de HBr à 31 % dans l'acide acétique. On élimine le solvant sous vide, on reprend le résidu dans de l'éther et de l'acide chlorhydrique dilué et on obtient le bromhydrate d'alpha-amino-N-[2-hydroxy-3-(4'-nitrophényloxy)-propyl]hydrocinnamamide.

30 EXEMPLE 11.

A une solution de 200 mg (0,88 mM) de 1,2-dihydroxy-4-(4'-nitrophényloxy)-butane et de 200 mg (0,96 mM) de N-carbobenzylglycine dans 10 ml de benzène, on ajoute 2 gouttes d'acide sulfurique concentré. On chauffe au reflux pendant 1 heure, on 35 laisse refroidir, on lave la solution benzénique successivement avec une solution 1 M de carbonate de sodium, de l'eau, une solution 0,5 M de periodate de sodium et deux fois avec de l'eau. On élimine le benzène et on laisse une matière solide blanche qu'on cristallise à partir d'un mélange d'éther de pétrole et d'acétate 40 d'éthyle pour obtenir ainsi le 1-(N-carbobenzoxy)aminoacétate de

1,2-dihydroxy-4-(4'-nitrophényloxy)-butane.

On dissout 75 mg de ce produit dans 0,5 ml d'une solution de HBr à 31 % dans de l'acide acétique. On secoue la solution pendant 15 minutes avec des chauffages périodiques légers au bain-marie bouillant. On ajoute de l'éther à la solution et on observe un précipité. L'extraction avec de l'eau donne une phase aqueuse qui contient 75 % du chromophore 4-nitrophényloxy utilisé dans la réaction. L'évaporation du solvant et la recristallisation à partir d'un mélange d'acétate d'éthyle et d'éthanol permettent d'obtenir le bromhydrate de glycératé de β -(4'-nitrophénoloxo)-2-hydroxypropyle.

Les exemples suivants illustrent le procédé de préparation des esters hydrolysables par voie enzymatique.

EXEMPLE 12.

15 On chauffe à 100°C pendant 2 heures une solution de 15 ml d'acétate de sodium dans de l'acide acétique glacial (1 M dans l'acétate de sodium) contenant 1,95 g (10 mM) de 1,2-oxydo- β -(4-nitrophénoloxo)-propane. On élimine l'acide acétique par évaporation et on fait passer le résidu sur une colonne d'acide silicique (4 x 10 cm) et on élue avec du chloroforme contenant 10 % de méthanol. L'éluent exempt d'acétate de sodium est ensuite évaporé à sec, et chromatographié avec de l'acide silicique et on obtient du 1-acétoxy-2-hydroxy-3-(4-nitrophénoloxo)-propane, du 1-hydroxy-2-acétoxy- β -(4-nitrophénoloxo)-propane et du 1,2-diacétoxy- β -(4-nitrophénoloxo)-propane qu'on peut cristalliser à partir d'un mélange d'acétate d'éthyle et d'éther de pétrole.

De façon analogue, on prépare les composés suivants :

1-acétoxy-2-hydroxy-4-(4'-nitrophénoloxo)-butane,

1-hydroxy-2-acétoxy-4-(4'-nitrophénoloxo)-butane,

50 1,2-diacétoxy-4-(4'-nitrophénoloxo)-butane,

1-acétoxy-2-hydroxy- β -(2',4'-dinitrophénoloxo)-propane,

1-hydroxy-2-acétoxy- β -(2',4'-dinitrophénoloxo)-propane,

1,2-diacétoxy- β -(2',4'-dinitrophénoloxo)-propane,

1-acétoxy-2-hydroxy-4-(2',4'-dinitrophénoloxo)-butane,

35 1-hydroxy-2-acétoxy-4-(2',4'-dinitrophénoloxo)-butane,

1,2-diacétoxy-4-(2',4'-dinitrophénoloxo)-butane,

1-acétylamino-2-hydroxy- β -(4'-nitrophénoloxo)-propane,

1-amino-2-acétoxy- β -(4'-nitrophénoloxo)-propane,

1-acétylamino-2-acétoxy- β -(4'-nitrophénoloxo)-propane,

40 1-acétylamino-2-hydroxy- β -(4'-nitrophénoloxo)-butane,

- 1-amino-2-acétoxy-3-(4'-nitrophényloxy)-butane,
 1-acétylamino-2-acétoxy-3-(4'-nitrophényloxy)-butane,
 1-acétylamino-2-hydroxy-3-(2',4'-dinitrophényloxy)-pro-
 pane,
 5 1-amino-2-acétoxy-3-(2',4'-dinitrophényloxy)-propane,
 1-acétylamino-2-acétoxy-3-(2',4'-dinitrophényloxy)-pro-
 pane,
 10 1-acétylamino-2-hydroxy-4-(2',4'-dinitrophényloxy)-buta-
 ne,
 15 1-amino-2-acétoxy-4-(2',4'-dinitrophényloxy)-butane,
 1-acétylamino-2-acétoxy-4-(2',4'-dinitrophényloxy)-buta-
 ne, etc.

De façon analogue, en utilisant un autre acide carboxylique comme réactif, on peut préparer les autres esters d'acides carboxyliques selon l'invention, comme les propionates, valérates, octanoates, décanoates, tridécanoates, hexadécanoates et octadécanoates, par exemple le 1-propionyloxy-2-hydroxy-3-(4'-nitrophényloxy)-propane, et les composés du même genre, le 1-propionylamino-2-hydroxy-3-(4'-nitrophényloxy)-propane et les composés 20 du même genre.

L'utilisation des sels de thioacides correspondants permet de préparer les mercapto-esters correspondants, comme par exemple :

- 25 1-acétylthio-2-hydroxy-4-(4'-nitrophényloxy)-butane,
 1-mercaptopro-2-acétoxy-4-(4'-nitrophényloxy)-butane,
 1-acétylthio-2-acétoxy-4-(4'-nitrophényloxy)-butane,
 1-acétylthio-2-hydroxy-3-(2',4'-dinitrophényloxy)-propa-
 ne,
 30 1-mercaptopro-2-acétoxy-3-(2',4'-dinitrophényloxy)-propane,
 1-acétylthio-2-acétoxy-3-(2',4'-dinitrophényloxy)-propa-
 ne,
 35 1-acétylthio-2-hydroxy-4-(2',4'-dinitrophényloxy)-buta-
 ne,
 1-mercaptopro-2-acétoxy-4-(2',4'-dinitrophényloxy)-butane,
 1-acétylthio-2-acétoxy-4-(2',4'-dinitrophényloxy)-buta-
 ne,
 40 etc. 1-acétylthio-2-hydroxy-3-(4'-nitrophényloxy)-propane,
 1-mercaptopro-2-acétoxy-3-(4'-nitrophényloxy)-propane,
 1-acétylthio-2-acétoxy-3-(4'-nitrophényloxy)-propane,

Pareillement, si l'on utilise un autre acide carboxylique comme réactif, on prépare les esters correspondants des acides carboxyliques, comme les propionates, valérates, octanoates, décenoates, tridécanoates, hexadécanoates et octadécanoates, par exemple 1-propionylthio-2-hydroxy-3-(4'-nitrophényloxy)-propane et les composés du même genre, le 1-propionylthio-2-hydroxy-4-(4'-nitrophényloxy)-butane et les composés du même genre.

EXEMPLE 13.

On chauffe au reflux pendant 17 heures une solution à 10 gueuse de phosphate dipotassique (10 ml, 0,5 M) et de 1,2-oxydo-3-(4-nitrophényloxy)-propene (0,5 mM, 98 mg), puis on la dilue à 100 ml et on la fait passer sur une colonne de DEAE-Sephadex (3 x 25 cm). On utilise comme éluant un gradient linéaire de bicarbonate de triéthylammonium (500 ml, 0,01 M, pH 7,5 dans le récipient mélangeur et 500 ml, 0,75 M dans le réservoir) pour obtenir du 1-phosphato-2-hydroxy-3-(4'-nitrophényloxy)-propane, du 1-hydroxy-2-phosphato-3-(4'-nitrophényloxy)-propane et du 1,2-diphosphato-3-(4-nitrophényloxy)-propane sous forme de leurs sels de triéthylammonium.

20 On maintient à température ambiante pendant deux jours une solution de 1 mM de 1,2-dihydroxy-3-(4'-nitrophényloxy)-propane dans 3 ml de pyridine sèche contenant 1,5 mM de sel de pyridinium de bêta-cyano-éthylphosphate et 0,35 g de dicyclohexylcarbodiimide. On ajoute de l'eau et après 2 heures, on filtre la 25 solution. On évapore à sec le filtrat et on le dissout de nouveau dans de l'hydroxyde d'ammonium 5 M. Après 90 minutes à 50°C, on évapore la solution et on place le résidu sur une colonne de DEAE-Sephadex (2,5 x 25 cm). On élue la colonne comme décrit plus haut. Après lyophilisation, on obtient sous forme de sels de tri-30 éthylammonium les composés suivants : 1-phosphato-2-hydroxy-3-(4'-nitrophényloxy)-propane, 1-hydroxy-2-phosphato-3-(4'-nitrophényloxy)-propane et 1,2-diphosphato-3-(4'-nitrophényloxy)-propane.

De même, on prépare les phosphates suivants :
 35 1-phosphato-2-hydroxy-4-(4'-nitrophénloxy)-butane,
 1-hydroxy-2-phosphato-4-(4'-nitrophénloxy)-butane,
 1,2-diphosphato-4-(4'-nitrophénloxy)-butane,
 1-phosphato-2-hydroxy-3-(2',4'-dinitrophénloxy)-propane,
 40 1-hydroxy-2-phosphato-3-(2',4'-dinitrophénloxy)-propane

ne,

1,2-diphosphato-3-(2',4'-dinitrophénolxy)-propane,
1-phosphato-2-hydroxy-4-(2',4'-dinitrophénolxy)-butane,
1-hydroxy-2-phosphato-4-(2',4'-dinitrophénolxy)-butane,

5

1,2-diphosphato-4-(4'-nitrophénolxy)-butane,
1-phosphatamino-2-hydroxy-3-(4'-nitrophénolxy)-propane,
1-amino-2-phosphato-3-(4'-nitrophénolxy)-propane,
1-phosphatamino-2-phosphato-4-(4'-nitrophénolxy)-propane,

ne,

10

1-phosphatamino-2-hydroxy-4-(4'-nitrophénolxy)-butane,
1-amino-2-phosphato-4-(4'-nitrophénolxy)-butane,
1-phosphatamino-2-phosphato-4-(4'-nitrophénolxy)-buta-

ne,

15

1-phosphatamino-2-hydroxy-3-(2',4'-dinitrophénolxy)-
propane,

16

1-amino-2-phosphato-3-(2',4'-dinitrophénolxy)-propane,
1-phosphatamino-2-phosphato-3-(2',4'-dinitrophénolxy)-
propane,

17

1-phosphatamino-2-hydroxy-4-(2',4'-dinitrophénolxy)-bu-

18

20 tane,
1-amino-2-phosphato-4-(2',4'-dinitrophénolxy)-butane,
1-phosphatamino-2-phosphato-4-(2',4'-dinitrophénolxy)-
butane, etc.

EXAMPLE 14.

25

A une solution de diméthylformamide et d'acide sulfurique concentré (2 ml; 3:1 vol/vol), on ajoute 195 mg (1 mM) de 1,2-oxydo-3-(4'-nitrophénolxy)propane. Après 1 heure à température ambiante, on ajoute 20 ml d'eau glacée et on neutralise la solution avec de l'hydroxyde d'ammonium. On purifie le produit soit

30

par chromatographie sur du papier Whatman de 3 mm dans le Solvant C soit par chromatographie sur du DEAE-Sephadex. Pour la chromatographie sur colonne, on dilue la solution de réaction à 100 ml avec de l'eau et on la fait passer sur une colonne de DEAE-Sephadex (50 x 4 cm).

35

Après lavage de la colonne avec de l'eau en une quantité égale à 5 à 6 volumes du lit, on élue la colonne en utilisant un gradient de bicarbonate de triéthylammonium (500 ml de sel 0,75 M dans le réservoir à pH 7,5 et 500 ml d'eau dans le récipient mélangeur). On élue l'ester sulfurique avec du bicarbonate de triéthylammonium (0,01 à 0,1 M). On combine les fractions 40 de ce pic et on les lyophilise pour obtenir les composés suivants

sous forme de leurs sels de triéthylammonium : 1-hydroxy-2-sulfato- β -(4'-nitrophényloxy)-propane, 1,2-disulfato- β -(4'-nitrophényloxy)-propane et 1-sulfato-2-hydroxy- β -(4'-nitrophényloxy)-propane.

On dissout 1 mM de 1,2-dihydroxy-4-(4'-nitrophényloxy)-propane dans 3 ml de diméthylformamide sec et froid contenant 0,41 g (2 mM) de dicyclohexylcarbodiimide. On ajoute ensuite une solution glaciée de 1,1 mM d'acide sulfurique dans 5 ml de diméthylformamide sec. Au bout de 15 minutes, on sépare la dicyclohexylurée précipitée par filtration, on évapore le filtrat pour obtenir une huile, on ajoute 100 ml d'eau au résidu et on fait passer cette solution sur une colonne de DEAE-Sephadex (2,5 x 25 cm). On développe la colonne en utilisant les mêmes conditions que précédemment, à ceci près que le gradient est de 0,01 à 0,5 M pour le bicarbonate de triéthylammonium. Les esters sulfuriques sont obtenus entre 0,01 et 0,1 M de bicarbonate de triéthylammonium et on les isole sous forme de leurs sels de triéthylammonium.

De façon analogue, on prépare les esters sulfuriques suivants :

- 1-sulfato-2-hydroxy-4-(4'-nitrophényloxy)-butane,
- 1-hydroxy-2-sulfato-4-(4'-nitrophényloxy)-butane,
- 1,2-disulfato-4-(4'-nitrophényloxy)-butane,
- 1-sulfato-2-hydroxy- β -(2',4'-dinitrophényloxy)-propane,
- 25 1-hydroxy-2-sulfato-3-(2',4'-dinitrophényloxy)-propane,
- 1,2-disulfato-3-(2',4'-dinitrophényloxy)-propane,
- 1-sulfato-2-hydroxy-4-(2',4'-dinitrophényloxy)-butane,
- 1-hydroxy-2-sulfato-4-(2',4'-dinitrophényloxy)-butane,
- 1,2-disulfato-4-(2',4'-dinitrophényloxy)-butane,
- 30 1-sulfatamino-2-hydroxy- β -(4'-nitrophényloxy)-propane,
- 1-amino-2-sulfato- β -(4'-nitrophényloxy)-propane,
- 1-sulfatamino-2-sulfato-3-(4'-nitrophényloxy)-propane,
- 1-sulfatamino-2-hydroxy- β -(4'-nitrophényloxy)-butane,
- 1-amino-2-sulfato- β -(4'-nitrophényloxy)-butane,
- 35 1-sulfatamino-2-sulfato-3-(4'-nitrophényloxy)-butane,
- 1-sulfatamino-2-hydroxy-3-(2',4'-dinitrophényloxy)-propane,
- 1-amino-2-sulfato- β -(2',4'-dinitrophényloxy)-propane,
- 1-sulfatamino-2-sulfato- β -(2',4'-dinitrophényloxy)-pro-
- 40 pane,

BAD ORIGINAL

1-sulfatamino-2-hydroxy-4-(2',4'-dinitrophényloxy)-butane,

1-amino-2-sulfato-4-(2',4'-dinitrophényloxy)-butane,

5 ne.

EXEMPLE 15.

On dissout 2 mM d'amino-acide de N-benzoyl-L-phénylalanine dans 1 ml de diméthylsulfoxyde (DMSO) sec contenant 2 mM de triéthylamine et on ajoute 2 mM de 1,2-époxy-β-(p-nitrophénoloxo)-10 propane. On chauffe la solution en bain-marie bouillant à l'abri de l'humidité jusqu'à ce que la c.c.m. (benzène:acétone = 9:1 ou 4:1) montre que la totalité de l'époxyde a réagi pour donner des produits ayant une valeur R_f beaucoup plus faible (durée de la réaction 3 à 4 heures). Après évaporation du DMSO sous un vide 15 poussé, on chromatographie le résidu sur du gel de silice (100 g, 0,05 à 0,2 mm, 44-210 microns) en utilisant comme éluant un mélange de benzène et d'acétone (4:1) pour obtenir ainsi l'ester 4-(4-nitrophénoloxo)-2-hydroxy-n-butylique de N-benzoyl-L-phénylalanine.

20 De façon analogue, on prépare l'ester 3-(4-nitrophénoloxo)-2-hydroxy-n-propylique de N-carbobenzoxy-L-phénylalanine, l'ester 4-(p-nitrophénoloxo)-2-hydroxy-n-butylique de N-carbobenzoxy-L-glycine, l'ester 3-(p-nitrophénoloxo)-2-hydroxy-n-propylique de N-t-butoxycarbonyl-L-tyrosine et l'ester 4-(p-nitrophénoloxo)-2-hydroxy-n-butylique de N-t-butoxycarbonyl-L-tyrosine.

On dissout 1 mM de l'ester 4-(p-nitrophénoloxo)-2-hydroxy-n-butylique de N-carbobenzoxy-L-glycine dans 5 ml d'acide trifluoracétique (TFA), on bouche hermétiquement le flacon et on le maintient pendant toute une nuit à une température de 30-40°C 30 (température du bain). On évapore à sec le mélange à une température inférieure à 40°C et on fait disparaître les dernières traces de TFA par deux co-évaporations avec addition d'un mélange d'éthanol absolu et de toluène. Le trifluoracétate de l'ester 3-(4-nitrophénoloxo)-2-hydroxy-n-propylique de glycine cristallise 35 lors de la trituration avec de l'éthanol absolu et peut être recristallisé à partir d'un mélange d'éthanol et d'éther.

L'évaporation avec un chlorhydrate 1 N permet d'obtenir le chlorhydrate de l'ester 3-(4-nitrophénoloxo)-2-hydroxy-n-propylique de glycine.

40 On dissout environ 400 mg de tétrafluoracétate brut de

l'ester β -(4-nitrophényloxy)-2-hydroxy-n-propyle de L-phénylalanine préparé de la façon décrite dans 40 ml de MeOH à 80 % et on applique la solution au sommet d'une colonne de Dowex-50 (H^+) (15 x 2 cm) équilibrée avec du MeOH à 80 %. On lave d'abord la colonne avec environ 500 ml de MeOH, puis avec 100 ml de HCl 0,01 N dans du MeOH à 80 %, on élue le produit avec du chlorhydrate 0,1 N dans du MeOH à 80 %, en surveillant l'élution à l'aide d'un analyseur aux rayons ultraviolets. On réunit les fractions qui contiennent le produit, on les évapore à sec (température inférieure à 40°C), on élimine la majeure partie du chlorhydrate en excès par des coévaporations répétées avec H_2O et on cristallise le résidu huileux par trituration avec de l'éthanol absolu. La recristallisation à partir d'un mélange d'éthanol et d'éther permet d'obtenir le chlorhydrate de l'ester β -(4-nitrophényloxy)-2-hydroxy-n-propyle de L-phénylalanine.

On laisse au repos à température ambiante pendant 1 heure 500 mg de l'ester β -(p-nitrophénoloxy)-2-hydroxy-n-propyle de L-tyrosine dans 6 ml d'acide trifluoracétique. L'évaporation de l'acide trifluoracétique donne une mousse blanche homogène par 20 c.c.m. On transforme les trifluoracétates en chlorhydrates par deux évaporations avec addition de 1 ml de chlorhydrate 1 N; on recristallise le chlorhydrate de l'ester β -(4-nitrophényloxy)-2-hydroxy-n-propyle de tyrosine à partir d'acétate d'éthyle et on le recristallise de nouveau à partir d'un mélange d'éthanol et 25 d'éther.

On obtient le chlorhydrate d'ester β -(4-nitrophényloxy)-n-butylique de tyrosine sous une forme cristalline à partir de H_2O et on le recristallise à partir d'un mélange d'éthanol et d'éther.

30 Les exemples ci-après illustrent le procédé permettant de mesurer l'activité enzymatique dans une matière biologique.
EXEMPLE 16.

A une solution de 1-phosphato-2-hydroxy-4-(4-nitrophénoloxy)-butane (7 moles/ml) formant substrat dans un tampon de 35 bicarbonate de sodium (0,1 M, pH 8,0) qu'on équilibre à 25°C, on ajoute une enzyme phosphononoestérase alcaline purifiée de E. Coli (10 μ l; 1,15 mg/ml). Périodiquement, on soutire des portions (0,4 ml) et on les ajoute à une solution oxydante (0,6 ml) à 50°C. La solution oxydante contient 2,7 moles de chlorhydrate de 40 méthylamine et 0,01 mole de periodate de sodium dans un tampon de

phosphate de potassium (0,1 N; pH 7,5). Pour l'analyse de chaque portion au bout de 5 minutes dans la solution oxydante à la température indiquée, on relève la densité optique de la solution à 400 m μ contre une solution -témoin qui contient tous les réactifs 5 à l'exception de l'enzyme, en utilisant des valeurs molaires d'-extinction de 11.200 à 318 m μ pour le substrat. La récupération de l'ion 4-nitrophénolate, mesurée par voie spectrophotométrique, est sensiblement théorique lors d'un titrage après 21 heures.

On obtient des résultats analogues en utilisant le 1-10 phosphato-2-hydroxy-4-(2,4-dinitrophényloxy)-butane avec la même enzyme et pour les deux substances avec la phosphomonoestérase acide des germes de blé.

EXEMPLE 17.

A une solution de carbonate/bicarbonate de sodium (1,0 15 m μ , pH 9,0, 0,1 N) contenant du 1-phosphato-2-hydroxy-4-(4'-nitrophényloxy)-butane (3,0 mM de sel d'ammonium), on ajoute 0,01 m μ de phosphomonoestérase alcaline (1 mg/ml, de sel fractionné selon Worthington Biochemistry Freehold, N.J.). Après un intervalle de temps donné (en minutes), on préleve 0,1 ml de la réaction 20 qu'on ajoute à une solution de métaperiodate de sodium (0,4 ml; 0,025 M 37). Après 2 minutes environ, on ajoute 0,5 ml (0,2 M) d'hydroxyde de sodium et on détermine le pouvoir absorbant de 4-nitrophényloxy à 400 m μ . La réaction est d'ordre zéro pendant au moins les 20 premières minutes et on hydrolyse 50 mM de substrat 25 par minute, par mg de protéine et par ml de solution de réaction. La couleur mesurée est proportionnelle à la quantité de l'enzyme ajoutée.

EXEMPLE 18.

On prépare des solutions de substrat contenant 100 mM 30 par ml de méthanol de l'un des esters suivants : ester 3-(4-nitrophényloxy)-2-hydroxy-n-propyle de L-glycine, ester 3-(4-nitrophényloxy)-2-hydroxy-n-propyle de L-tyrosine, ester 4-(4-nitrophényloxy)-2-hydroxy-n-butylique de L-tyrosine et ester 3-(4-nitrophényloxy)-2-hydroxy-n-propyle de L-phénylalanine.

35 On prépare des solutions enzymatiques aux concentrations suivantes : 2,5 mg d'alpha-chymotrypsine/25 ml de HCl 0,001 N; 2,5 mg de trypsine/25 ml de HCl 0,001 N; 2,5 mg de pepsine/25 ml d'acétate de sodium 0,1 N à pH 4,5; 2,5 mg de pepsine/25 ml d'eau; 2,5 mg de panprotéase/25 ml d'eau; 2,5 mg de pronase/25 ml 40 d'eau.

On détermine l'activité des estirases en mélangeant 0,1 ml de la solution de substrat avec 0,1 ml de tampon phosphaté (0,05 M, pH 6) et en équilibrant le mélange à 37°C. On ajoute ensuite périodiquement 0,1 ml de la solution de l'enzyme à 37°C, on 5 préleve des portions de 0,1 ou 0,05 ml et on les fait tomber à l'aide d'une pipette dans une capsule contenant 5 ou 6,5 ml d'acétate de sodium et 0,05 ml de periodate, après quoi on effectue le titrage de la façon décrite plus loin. Le témoin contient 0,1 ou 0,05 ml de chlorhydrate 0,001 N au lieu de la solution enzymatique et on effectue son incubation exactement comme pour l'échantillon.

À l'aide d'une pipette, on transfère 0,1 ml du produit de réaction enzymatique dans une capsule de 1 ml contenant 0,6 (ou 0,55) ml de tampon acétate de sodium (0,1 M, pH 4,5) et 0,05 15 ml de métaperiodate de sodium (0,1 M). Après 5 minutes dans un bain-marie à 50°C, on ajoute 0,05 ml d'éthylène-glycol aqueux (0,2 M) et on maintient la cellule pendant 5 minutes de plus à 50°C. On réduit quantitativement l'excès de periodate avant d'alcaliniser la solution. Après la réduction, on ajoute 0,2 ml (volume total 1 ml) de chlorhydrate de méthylamine (environ 5 M, pH 0,5) et on mesure le pouvoir absorbant à une longueur d'onde de 400 m μ au bout de 5 minutes (lorsqu'il s'agit d'esters de propane-diol, après 25 minutes à 50°C). Le témoin contient tous les mêmes ingrédients sauf l'enzyme et il est mis en incubation comme 25 l'échantillon. Un pouvoir absorbant de 1,80 correspond à 0,1 mM de l'amino-ester par ml. (λ_{max} méthylamine pH 9,5 de p-nitrophénolate = 400 m μ , ϵ = 18.000), ce qui indique l'hydrolyse de 0,1 ml d'ester d'amino-acide par l'enzyme.

Les essais ci-dessus démontrent que l'ester β -(4-nitro-30 phényloxy)-propyle de L-glycine est un excellent substrat pour l'alpha-chymotrypsine et la trypsin au pH 6. En outre, l'ester β -(4-nitrophénoloxy)-N-propyle de tyrosine est également un bon substrat pour la pan-protéase et la pronase.

EXEMPLE 19.

35 On prépare des solutions de substrats en utilisant la 2-hydroxy-4-(p-nitrophénoloxy)-N-(L-tyrosyl)-1-butylamine et la 2-hydroxy- β -(p-nitrophénoloxy)-N-(L-phénylalanyl)-1-propylamine contenant environ 20 mmoles par ml de tampon phosphate 0,01 M, pH 6, 7, 8 et 9. Dans le cas de la 2-hydroxy-4-(p-nitrophénoloxy)-N-(N'-acetyl-L-tyrosyl)-1-butylamine et de l'ester 2-hydroxy-4-(p-ni-

trophénoxy)-n-butylique de N-acétyl-L-tyrosine, on utilise des solutions saturées, leurs solubilités respectives dans des tampons phosphate 0,01 M étant d'environ 1 millimole par ml et diminuent à des pH plus élevés.

5 A 1 ml de solution de substrat à 37°C, on ajoute à la pipette 10 λ d'une solution de l'enzyme dans du HCl 0,001 N, également équilibrée à 37°C et après incubation à 37°C, on préleve des portions et on effectue des titrages à certains intervalles de temps.

10 On effectue le titrage comme suit : on introduit à la pipette 0,1 ml de la réaction enzymatique dans une capsule de 1 ml contenant 0,2 ml d'une solution I (solution I = 0,1 M d'acétate de sodium-0,01 M de NaIO₄, 1:1); après 5 minutes dans un bain-marie à 50°C, on ajoute 0,7 ml d'une solution II (Solution II = 15 0,2 M d'éthylène-glycol - environ 2,5 M de méthylamine, réglée à pH 9,5 avec HCl, 1:6) et on mesure le pouvoir absorbant à λ = 400 $\mu\mu$ au bout de 5 minutes ou au bout de 25 minutes selon la nature du substrat.

a) Dans le cas d'esters d'aminoacides de 4-(p-nitrophénoxy)-1,2-butanediol ou d'amides d'amino-acides de 4-(p-nitrophénoxy)-2-hydroxy-1-butylamine, l'élimination du p-nitrophénolate est quantitative en 5 minutes à la température ambiante et on mesure donc le pouvoir absorbant 5 minutes après l'addition de la solution II.

25. b) Dans le cas d'esters d'amino-acides de 3-(p-nitrophénoxy)-1,2-propanediol ou d'amides d'amino-acides de 3-(p-nitrophénoxy)-2-hydroxy-1-propylamine, on maintient la capsule à 50°C pendant 25 minutes avant de mesurer le pouvoir absorbant à λ = 400 pour assurer une élimination à 50 % suffisamment reproductible du p-nitrophénolate.

Le témoin contient tous les ingrédients de l'échantillon, à ceci près que la solution enzymatique est remplacée par du HCl 0,001 N. Les calculs sont basés sur le coefficient d'extinction de 18.000 déterminé pour le p-nitrophénolate dans environ 2 moles de méthylamine à pH 9,5.

Les expériences ci-dessus indiquent que les amides des amino-acides de 2-hydroxy-4-(p-nitrophénoxy)-1-butylamine et 2-hydroxy-3-(p-nitrophénoxy)-1-propylamine respectivement sont hydrolysés par diverses enzymes protéolytiques, à savoir l'alpha-40 chymotrypsine, la pan-protéase, la pronase et la peptidase à une

petite vitesse. La α -hydroxy-4-(*p*-nitrophén oxy)-N-(N'-acétyl-L-tyrosyl)-1-butylique est hydrolysée par l'alpha-chymotrypsine avec un $K_0 = 0,0095 \text{ mM/min/mg d'enzyme/ml}$. Les esters des alpha-amino-acides avec un α -OH dans le fragment alcool sont en général hydrolysés très facilement à des pH d'environ 7. L'ester β -hydroxy-4-(*p*-nitrophén oxy)-n-butylique de N-acétyl-L-tyrosine est un substrat actif pour l'alpha-chymotrypsine et d'autres enzymes protéolytiques.

L'exemple suivant illustre le procédé permettant de mesurer les concentrations de periodates.

EXEMPLE 20.

On prépare deux solutions exactement identiques contenant un periodate. On utilise la solution "initiale" pour déterminer le periodate initialement présent et on utilise la solution de "réaction" pour déterminer le periodate présent après la réaction d'oxydation du composant inconnu. On ajoute le composant inconnu à la solution de "réaction" et, après l'achèvement de l'oxydation, on ajoute du 1,2-dihydroxy-4-(4-nitrophén oxy)-butane aussi bien à la solution "initiale" qu'à la solution de "réaction". Après 15 minutes, on ajoute un tampon alcalin aux deux solutions et après 5 minutes, on détermine leur couleur à 400 m μ . La quantité de 1-phosphato-2-hydroxy-4-(4'-nitrophén oxy)-butane ajoutée est environ triple de la quantité de periodate dans la solution "initiale" et la quantité de periodate dans cette solution est suffisante pour donner environ 0,8 unité A₄₀₀ après traitement avec le tampon alcalin. La quantité de periodate consommée par l'échantillon inconnu est le quotient de la différence entre la valeur A₄₀₀ de la solution "initiale" et la valeur A₄₀₀ de la solution de "réaction" par la valeur molaire d'extinction de l'ion 4-nitrophénolate.

On met en œuvre ce procédé avec le 5'-phosphate d'adénosine (en qualité d'ingrédient inconnu) sous forme d'une solution aqueuse de ce phosphate (0,0488 M; sel sodique), une solution aqueuse de 1,2-dihydroxy-4-(4'-nitrophén oxy)-butane (0,015 M) et des valeurs molaires d'extinction de $\epsilon = 1,12 \times 10^4$ à 318 m μ pour le 1,2-dihydroxy-4-(4'-nitrophén oxy)-butane et du periodate de sodium aqueux (0,0518 M) et on détermine la concentration de l'ion periodate à une valeur $\epsilon = 157,9$ à 300 m μ dans un tampon acétate (1 M; pH 4,5).

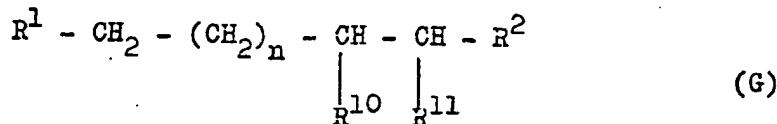
"réaction", on ajoute 0,2 ml de 1,2-dihydroxy-4-(4'-nitrophényloxy)-butane en solution. Après 15 minutes, on ajoute une portion (0,05 ml) de ce mélange à un tampon bicarbonate/carbonate de sodium (0,95 ml; 0,1 M; pH 9,5). Après 5 minutes à 50°C, on effectue des "lectures" à 400 m μ pour la solution et pour un témoin qui ne contient pas de periodate. On trouve pour la solution "initiale" 0,85 et pour la solution de "réaction" 0,465. Le quotient de cette différence (0,385) par la valeur molaire d'extinction de l'ion p-nitrophénolate ($1,64 \times 10^4$) est de $2,3 \times 10^5$ M, ce qui donne une analyse de 96 % de la théorie.

Quand on répète cette opération en utilisant du 1,2-dihydroxy-4-(2,4-dinitrophényloxy)-butane et une valeur molaire d'extinction $\epsilon = 9,5 \times 10^3$ à 301 m μ , on obtient des résultats similaires.

On utilise ce même procédé pour déterminer les concentrations de D-arabitol et de D-glucose ainsi que la teneur en glycol dans les acides ribonucléiques et avec des triglycérides tels que la tripalmitine, les résultats obtenus étant similaires dans chaque cas.

REVENDICATIONS

1. Composé répondant à la formule :



dans laquelle R^1 est un groupe indicateur, n est 0 ou 1, R^2 est un atome d'hydrogène ou un anticorps ou antigène couplé, R^{10} est un groupe hydroxy ou un groupe hydrolysable par voie enzymatique et R^{11} est un groupe hydroxy, amino, mercapto ou un groupe hydrolysable par voie enzymatique, avec la condition que lorsque R^2 est un atome d'hydrogène et que R^{10} et R^{11} sont tous deux autres que des groupes hydrolysables par voie enzymatique, n doit être égal à 1.

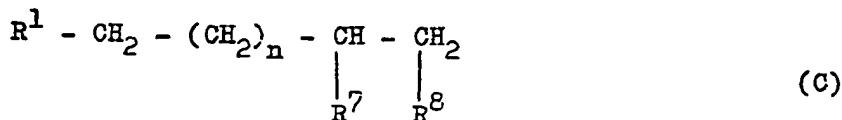
15 2. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que n est 1.

3. Composé selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que R^1 est un groupe 4-nitrophényloxy, 2,4-dinitrophényloxy, fluorescéine ou méthoxyfluorescéine.

20 4. Composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que R^{10} et R^{11} sont des groupes hydroxy.

5. Composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que R^2 est l'hydrogène.

25 6. Application des composés selon la revendication 1, à la mesure de l'activité d'une enzyme, caractérisée en ce qu'elle consiste à hydrolyser un composé de formule G dans laquelle R^2 est l'hydrogène et au moins l'un des groupes R^{10} et R^{11} est un groupe hydrolysable par voie enzymatique, n et R^1 étant tels que définis dans la revendication 1, avec une enzyme convenable pour 30 obtenir un composé de formule :



35 dans laquelle n et R^1 sont tels que définis plus haut, R^7 est un groupe hydroxy et R^8 est un groupe hydroxy, amino ou mercapto ; et à traiter un composé de formule (C) avec un agent oxydant capable de cliver les atomes de carbone portant les substituants R^7 et R^8 , puis à éliminer le groupe indicateur (R^1).

40 7. Application selon la revendication 6, caractérisée

en ce que le groupe hydrolysable par voie enzymatique est un groupe acétoxy, phosphato ou sulfato.

8. Application selon la revendication 7, caractérisée en ce que R¹¹ représente le groupe hydrolysable par voie enzymatique et R¹⁰ est le groupe hydroxy.

9. Application selon l'une quelconque des revendications 6 à 8, caractérisée en ce que R¹ est un groupe 4-nitrophényloxy, 2,4-dinitrophényloxy, fluorescéine ou méthoxyfluorescéine, que l'agent oxydant est un ion periodate et qu'on effectue l'élimination avec une amine aliphatique primaire ou secondaire.